

PROCEDE DE PRODUCTION D'UN CONCENTRAT LIQUIDE DE BACTERIES
ADAPTEES ET VIABLES A USAGE ALIMENTAIRE.

5 La présente invention concerne un procédé de production d'un concentrat liquide de bactéries adaptées et viables à usage alimentaire. De manière préférentielle mais non limitative, les bactéries produites sont des bactéries lactiques.

10 L'ingestion de certaines souches de bactéries, en particulier celles qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont particulièrement bénéfiques au niveau de la santé, notamment en favorisant un bon fonctionnement de la flore intestinale. En effet, ces bactéries produisent des bactériocines et de l'acide lactique qui augmentent la digestibilité des aliments, favorisent le péristaltisme intestinal, et accélèrent l'évacuation des selles. De plus, ces bactéries produisent
15 certaines vitamines du complexe B, et favorisent en général l'absorption des vitamines et minéraux, diminuent le cholestérol sanguin, renforcent le système immunitaire et tapissent les muqueuses intestinales afin de protéger contre l'invasion et les activités des microorganismes nuisibles.

De ce fait, depuis plusieurs années, les industries agroalimentaires tentent
20 d'incorporer de telles bactéries dans leurs produits finaux, le plus généralement des yaourts.

Actuellement, ces bactéries sont produites de façon commerciale, sous une forme congelée ou lyophilisée. Cependant, ces processus de production sont traumatisants pour les bactéries qui perdent une partie de leur activité et parfois leur viabilité. Cela
25 est préjudiciable pour les industriels producteurs et pour les consommateurs de ces produits car les bactéries doivent satisfaire aux exigences de qualité et de performances technologiques, si possible pendant plusieurs mois. Il serait donc souhaitable de produire les bactéries par un procédé leur assurant une viabilité et une activité maximale. A cet effet, une méthode consiste à produire les bactéries sous une forme
30 liquide. Cependant il a été mis en évidence que cette méthode génère également une mortalité importante des bactéries, après l'introduction des bactéries dans le produit final.

En outre, pour diminuer les coûts de stockage des bactéries et faciliter l'adjonction des bactéries dans le produit final, il serait souhaitable de concentrer les bactéries sous forme liquide. Pour cela, l'homme du métier utilise de manière habituelle une étape de centrifugation ou de filtration. Cependant, la centrifugation est
5 un processus traumatisant pour les bactéries, qui peut entraîner une forte mortalité cellulaire notamment due à un fort cisaillement et de plus, ce procédé n'est pas bien adapté pour la centrifugation de faibles volumes tels que ceux requis dans la production de bactéries destinées à être additionnées en tant que probiotiques à des produits alimentaires. Concernant une étape de filtration classique, celle-ci pose
10 également des problèmes de mortalité des bactéries et de colmatage des filtres par les bactéries.

Il serait donc souhaitable de produire un volume souhaité de concentrât liquide de bactéries qui présentent une activité et une viabilité maximale après l'étape de concentration et après l'introduction dans le produit final.

15 De manière surprenante et inattendue, les inventeurs ont montré qu'une étape d'adaptation des bactéries permettait d'augmenter de manière significative l'activité et la viabilité des bactéries après l'introduction dans le produit final.

De plus, les inventeurs ont montré qu'une étape de filtration tangentielle, sous certaines conditions particulières (pression, concentration, porosité de membrane, etc),
20 permettait de concentrer les volumes souhaités de culture de bactéries, tout en préservant leur viabilité et sans colmatage des filtres.

La filtration tangentielle permet de produire deux courants en fonction de la nature et de la structure de la membrane : le perméat (le milieu de culture sensiblement exempt de bactéries) et le rétentât (contenant les bactéries, appelé aussi concentrât).
25 Dans une filtration tangentielle, le fluide circule non pas perpendiculairement mais parallèlement à la surface de la membrane et assure ainsi par sa vitesse d'écoulement un auto nettoyage qui prévient l'accumulation de dépôts qui obturent la surface de filtration (appelé communément colmatage des filtres).

Un objet de la présente invention est donc un procédé de production d'un
30 concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, à usage alimentaire comprenant les étapes successives suivantes :

- a) On propage les bactéries dans un fermenteur dans un milieu de culture approprié ;
- b) On adapte les bactéries obtenues à l'étape a) ;
- c) On lave le milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle avec l'aide d'une solution de lavage ;
- d) On concentre en bactéries le milieu lavé contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle jusqu'à une concentration bactérienne supérieure à 5.10^{10} ufc/ml avantageusement supérieure à 1.10^{11} ufc/ml ;
- e) On récupère un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, à usage alimentaire.

Par bactéries, on entend désigner préférentiellement selon la présente invention des bactéries lactiques, du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.* et en particulier *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*.

Par bactéries adaptées, on entend désigner, selon la présente invention, des bactéries plus résistantes à différents stress, en particulier liés à différents stress physicochimiques.

Selon la présente invention le milieu de culture de l'étape a) est un milieu synthétique.

Par milieu synthétique, on entend désigner selon la présente invention un milieu dans lequel sont introduits des composants soumis à un contrôle quantitatif et qualitatif rigoureux.

Selon la présente invention, la solution de lavage est adaptée à l'utilisation alimentaire du concentrât de bactéries et présente une pression osmotique compatible avec la viabilité des bactéries.

Selon la présente invention le milieu de culture, contenant les bactéries dans le fermenteur à la fin de l'étape a), a un pH compris entre 3 et 6.

Selon la présente invention, la concentration en bactéries, à la fin de l'étape a) de propagation, est supérieure à 2.10^{10} ufc/ml.

De plus, les inventeurs ont montré que l'adaptation des bactéries réalisée à l'étape b) permet de réduire la mortalité des bactéries provoquée par le changement de milieu des bactéries, entre leur milieu de culture et le produit alimentaire final à additiver.

Selon la présente invention l'adaptation des bactéries est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture. Selon la présente invention, les paramètres du milieu de culture sont préférentiellement le pH, la pression osmotique et/ou la température.

D'autres paramètres pour la mise en évidence de l'adaptation des bactéries sont possibles, comme par exemple la concentration en sucre du milieu bactérien.

Préférentiellement, dans le cas où le paramètre du milieu de culture est le pH, l'étape b) est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.

Afin d'effectuer l'étape d'adaptation des bactéries au pH par acidification naturelle, on peut par exemple mesurer la concentration en sucre du milieu de fermentation et au-delà d'une concentration seuil pour chaque espèce de bactéries, on sait que le pH n'est plus régulé et l'adaptation au milieu devient très aisée.

Ainsi, par exemple, si la concentration en sucre du milieu de fermentation de *Lactobacillus casei* est de 9 g/L, le pH n'est plus régulé et est environ égal à 5. Il devient alors plus aisé pour la souche adaptée d'être ajoutée à un nouveau milieu et ceci permet une viabilité plus importante des bactéries dans le milieu final.

Selon la présente invention, le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.

Préférentiellement, dans le cas où l'adaptation est mise en évidence par la taille des bactéries, la distribution des longueurs de chaque bactérie dudit concentrât se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.

La mesure de la taille des bactéries se fait par un moyen adapté.

Un moyen adapté peut être par exemple un prélèvement régulier de bactéries suivi d'une mesure de la taille des bactéries par cytométrie de flux.

En outre, selon la présente invention, la filtration tangentielle peut être utilisée pour l'étape b) d'adaptation des bactéries.

Selon la présente invention la ou les membranes de filtration tangentielle sont d'une porosité comprise entre 0.01 et 0,5 μm et de manière préférentielle, entre 0.1 et 0.3 μm .

Ces membranes sont utilisées pour les étapes c) et d) du procédé et éventuellement l'étape b).

Les membranes de filtration sont caractérisées par:

- la porosité et l'épaisseur de la couche filtrante dont dépend le débit de perméat.
- le diamètre des pores et leur répartition dont dépend l'efficacité de séparation.
- le matériau employé dont dépend la résistance mécanique, chimique, thermique

et la facilité de nettoyage.

Par membrane de filtration, on entend désigner des membranes organiques ou minérales.

Les membranes organiques peuvent être composées entre autre d'acétate de cellulose, de polyamides aromatiques, de polysulfone, d'esters de cellulose, de cellulose, de nitrate de cellulose, de PVC, ou de Polypropylène.

Les membranes minérales peuvent être composées entre autre de céramique frittée, de métal fritté, de carbone, ou de verre.

Selon la présente invention le milieu de culture contenant les bactéries est maintenu à une température entre 25 et 45°C, et préférentiellement entre 35 et 39°C

Selon la présente invention la température est diminuée de 1 à 44°C à l'étape b) de façon à adapter la souche à la température du produit final où elles seront additionnées.

Selon la présente invention, à l'étape c) la pression d'entrée du milieu de culture dans le module de filtration est comprise entre 0 et 3.10⁵ Pa.

Selon la présente invention, dans les étapes c) et d) le débit de perméat est compris entre 0,001 et 0,1 m³/h/m² de surface d'échange.

Selon la présente invention dans l'étape d), la pression transmembranaire est comprise entre 0,1.10⁵ et 2.10⁵ Pa, préférentiellement entre 0,1.10⁵ et 0,5.10⁵ Pa et avantageusement entre 0,1.10⁵ et 0,5.10⁵ Pa.

La membrane se présente comme une pure barrière mécanique laissant passer les composés de taille inférieure au diamètre des pores. La séparation entre les deux phases liquides est obtenue en appliquant une différence de pression entre le côté où

circule le milieu de culture contenant les bactéries et celui où circule le perméat (le milieu de culture sensiblement exempt de bactéries). Cette différence de pression est communément appelée pression transmembranaire.

5 La recirculation du milieu de culture comprenant les bactéries, en boucle fermée, dans le module de filtration tangentielle permet la concentration des bactéries et la filtration du milieu de culture à travers la membrane, en limitant le colmatage.

Selon la présente invention dans l'étape d), le débit de recirculation du milieu lavé est compris entre 0,5 et 3 m³/h/m² de surface d'échange et avantageusement entre 0,8 et 1,25 m³/h/m² de surface d'échange.

10 Selon la présente invention le procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables comporte préalablement à l'étape a) les étapes successives de revivification et préculture des bactéries.

Afin de réduire au maximum la phase de latence en fermenteur, le micro-organisme est utilisé en pleine phase exponentielle de croissance. Pour ce faire, les
15 inventeurs procèdent en deux étapes :

- Réalisation d'une revivification en tube de bactéries précédemment congelées à -80°C
- Préculture en erlenmeyer qui sert à multiplier le nombre de microorganismes. Il conviendra de stopper leur croissance en phase
20 exponentielle maximale de croissance.

Selon la présente invention, le procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables comporte une étape supplémentaire f) après l'étape e), de conditionnement en poches souples, hermétiques et stériles du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables .

25 Par poches souples hermétiques, on entend désigner selon la présente invention et de manière préférentielle des poches en plastique alimentaire.

Selon la présente invention, le procédé peut comporter une étape supplémentaire g) après l'étape optionnelle f) de conservation à des températures basses comprises entre -50°C à +4°C du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné
30 en poches souples et hermétiques).

De manière optionnelle, il est possible de rajouter au concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples, et conservé à des

températures basses, des molécules cryoprotectrices telles que le saccharose par exemple.

Selon la présente invention, le procédé peut comporter une étape supplémentaire h), après l'étape g) de réchauffage par un moyen adapté dudit concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples et hermétiques..

Par moyen adapté, on entend désigner par exemple selon la présente invention l'utilisation d'un bain marie à une température non létale pour les bactéries, par exemple 37°C.

Un objet de la présente invention est également un dispositif pour la mise en œuvre du procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables à usage alimentaire selon la présente invention caractérisé en ce qu'il comprend une cuve (1) contenant une solution de lavage, un conduit d'arrivée (2) de ladite solution de lavage dans un fermenteur (3), ledit fermenteur (3) servant à la propagation des bactéries dans un milieu de culture, un conduit de sortie (4) pour acheminer le milieu de culture contenant les bactéries vers un ou plusieurs modules (5) de microfiltration tangentielle, lesdits modules (5) permettant la séparation dudit milieu de culture en un perméat (6) ne contenant pas de bactéries et en un concentrât (7) contenant les bactéries .

Sur la figure 1 est représenté le dispositif selon la présente invention.

Selon la présente invention, le concentrât (7) est recyclé à la sortie des modules (5) de filtration par réincorporation dans le fermenteur (3).

Selon la présente invention, le ou les modules (5) de filtration comprennent de 1 à 10 membranes de filtration, chaque membrane représentant de 0.1m² à 150 m² de surface totale de filtration et une porosité comprise entre 0.01 et 0.5 µm, et préférentiellement comprise entre 0.1 et 0.4 µm.

Un objet de la présente invention est également un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables susceptibles d'être obtenu par le procédé selon la présente invention.

Un objet de la présente invention est également l'utilisation du concentrat liquide de bactéries adaptées et viables, selon la présente invention en tant qu'additif alimentaire.

Par additif alimentaire, on entend désigner selon la présente invention toute substance chimique ajoutée aux aliments durant leur préparation ou en vue de leur entreposage pour obtenir un effet technique désiré. De plus, selon la présente invention, le concentrât liquide de bactéries possède une numération stable, les bactéries étant viables et n'effectuant pas de fermentation dans le produit final additivé.

Un objet de la présente invention est également un produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon la présente invention.

Selon la présente invention, le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.

Par produit laitier on entend désigner selon la présente invention, en plus du lait, les produits dérivés du lait, tels la crème, la crème glacée, le beurre, le fromage, le yogourt; les produits secondaires, comme le lactosérum, la caséine ainsi que divers aliments préparés contenant comme ingrédient principal du lait ou des constituants du lait.

Par boisson on entend désigner selon la présente invention des boissons comme par exemple les jus de fruits, les mélanges de lait et de jus de fruits, les jus végétaux tels que par exemple le jus de soja, le jus d'avoine ou le jus de riz, les boissons alcoolisées comme par exemple le kéfir, les sodas, et les eaux des source ou minérales additionnées ou non de sucre ou d'arômes par exemple.

Un objet de la présente invention est également un procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon la présente invention, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et préférentiellement avant le conditionnement du produit alimentaire.

Selon la présente invention, le procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé est caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en ligne par pompage.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, selon la présente invention.

Il va de soi, toutefois que ces exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne sauraient constituer en aucune manière une limitation.

LEGENDE DES FIGURES :

Figure 1 : Dispositif de concentration des bactéries par filtration tangentielle

Figure 2 : Evolution de la pression transmembranaire dans le temps

10 **Figure 3** : Evolution de la pression d'entrée module

Figure 4 : Evolution des débits rétentat

Figure 5 Evolution de la densité optique à 580 nm et de la pression transmembranaire.

15 EXEMPLES:

Dans ces exemples, les pressions sont indiquées en bars, un bar correspondant à 1.10^5 Pa.

L Revivification et préculture

- Préparation du milieu de culture

20 Le milieu de culture de départ est le milieu MRS (milieu de culture sélectif utilisé pour la culture des lactobacilles) liquide sans sucre en bouteille (95ml). On y ajoute stérilement notre source de carbone principale pour avoir en final 10g/l s'il s'agit d'un disaccharide ou de 20 g/l pour un monosaccharide. Ici 1 g de lactose est repris dans 5 ml d'eau distillée chaude puis l'ensemble est filtré sur filtre de porosité
25 0.2µm et additionné en totalité dans la bouteille de 95 ml de MRS. 10 ml sont transférés dans un tube stérile ; ils sont destinés à la réalisation de la revivification. Le restant (90 ml de MRS à 10 g/l de lactose) sera utilisé pour la préculture.

- Conditions de croissance de la revivification (10 ml)

- 30
- 37°C
 - en statique dans une étuve
 - inoculation à 1% à partir d'un tube congelé à -80°C

- durée : 16h
- Densité Optique mesurée en fin de culture sur un échantillon dilué au 1/20 à 580 nm contre une cuve d'eau : 0.35 à 0.4
- pH : proche de 4

5

- *Conditions de croissance de la préculture (500ml)*

- 37°C
- en statique dans une étuve
- inoculation à 1% à partir de la préculture
- durée : 16h
- Densité Optique mesurée en fin de culture sur un échantillon dilué au 1/20 à 580 nm contre une cuve d'eau : 0.35 à 0.4
- pH : proche de 4

10

15 **II. Propagation en fermenteur**

- *Préparation d'une base de régulation du pH*

Le KOH à 38% (soit à 9.3 mol/l) est utilisé pour neutraliser l'acide lactique produit. On stérilise à 121°C pendant 15 minutes.

Le volume prérequis pour une propagation de 10 litres est de 1000 ml minimum.

20

- *Préparation d'un milieu de propagation*

Les sources carbonées et azotées sont stérilisées séparément pour éviter les réactions de dégradation du sucre (formation de composés de Maillard lors de la stérilisation)

25 Pour 10 litres de milieu de propagation en final :

○ Pied de cuve

- | | | |
|---|-------|---------------------|
| - Tryptone de peptone de caséine (Merck) | 600g | |
| - Extrait de levure (Merck) avec HCl à 6mol/l | 180 g | Ajuster le pH à 6.5 |
| 30 - MnSO ₄ , H ₂ O | 1 g | qsp à 5.5 litres |

Stériliser à 121°C 15 minutes dans le fermenteur préalablement stérilisé à l'eau.

- o Solution de source de carbone

- Lactose 800 g

- Dissoudre à chaud puis compléter à 4 litres

- Stériliser à 110°C 30 minutes

5 Transférer stérilement cette solution à froid dans le pied de cuve

- *Conditions de propagation en fermenteur*

- o Volume avant inoculation : 9.5 litres

- o 37°C

10 o pH régulé à 6.5 avec KOH 10 mol/l

- o durée : 18h

- o agitation 200 rpm, axe d'agitation équipé de 3 pâles immergées

- o dégazage à l'azote

- o alimentation permanente en azote par le dessus (débit 1l/minute)

15 o inoculation à 5% à partir de la préculture soit 500 ml

- o Densité Optique finale mesurée en fin de culture sur un échantillon dilué au 1/100 à 580 nm contre une cuve d'eau : 0.32 à 0.35

Après propagation, on obtient un milieu contenant 2.10^{10} ufc/ml de bactéries.

20 **III. Adaptation et lavage de la culture**

Afin de préparer la biomasse produite au pH, et/ou à la pression osmotique et/ou à la température du produit final (type yoghourt) dans lequel elles seront injectées, deux étapes sont réalisées conjointement :

25 -Après 17 heures de culture, une descente du pH est réalisée par acidification naturelle sur une heure pour passer de pH 6,5 à pH5 (= pH cible avant lavage).

- Un lavage des bactéries (à 37°C) est effectué après le batch (après l'étape d'acidification à pH5).

Le lavage est réalisé avec une solution de saccharose à 250 g/l, stérilisée 30 minutes à 100°C, qui correspond à une solution de pression osmotique de 1000 mOsm.

30 Ce choix est optimisé pour minimiser les risques de choc osmotique lors du passage d'un milieu synthétique au produit final dont les paramètres mesurés sont pH 5 et une pression osmotique de 879 mOsm.

Les étapes lors du lavage sont le démarrage de la boucle de filtration, recirculation des bactéries à travers le système et injection de la solution de lavage/soutirage du filtrat au même débit.

5 *Démarrage du système de filtration*

Lors du démarrage de la filtration, on procède à la formation de la couche de polarisation en faisant fonctionner le système 5 minutes à vitesse réduite (20 à 50% du débit maximal de la pompe) avec les vannes d'entrée et de sortie du module en position ouverte à 100%. La vanne de sortie perméat étant fermée. Une fois ce délai
10 passé, le régime de la pompe est progressivement augmenté à 100% de sa plage d'utilisation. La vanne perméat est ouverte à 100% et conservée dans cette position durant toute l'étape de filtration.

Pour maintenir un volume constant de milieu réactionnel lors du lavage, le
15 volume de perméation doit être équivalent à celui de l'alimentation (D1). Le débit d'alimentation de la solution de lavage est identique à celui du perméat. Le volume de la solution est passé dans une période variant entre 1 et 2 heures. Passé ce délai, les conditions de filtration restent inchangées, la concentration volumique débute.

20 **IV. Concentration par microfiltration tangentielle.**

La filtration du milieu est effectuée dans une plage de température comprise entre 25 et 44°C au pH cible compris entre 3,5 et 5,5 durant 4 heures. Le débit de filtration diminue fortement avec l'avancement de la culture et les modifications des caractéristiques rhéologiques du milieu. La pression d'entrée de la boucle augmente
25 pour atteindre une valeur de 3 bars, représentant la limite supérieure supportable par les membranes de filtration. La recirculation du milieu est alors stoppée et le concentrât bactérien est récupéré stérilement. Cette méthode permet l'obtention d'un litre de liquide crémeux contenant au moins 1.10^{11} ufc/ml de bactéries.

- *Conditions opératoires*

30 **1. Stérilisation du système complet.**

- la boucle de filtration est stérilisée par passage de vapeur fluente. Pour effectuer cette opération, le module de filtration doit être équipé d'écrous de compensation de dilatation.

5 L'efficacité du traitement est évaluée par le calcul de la valeur stérilisatrice F_0 . C'est le temps en minutes d'un barème de stérilisation qui a la même efficacité à la température de référence : 121.1°C.

Soit t , le temps du traitement, soit T la température du traitement, avec $z = 10^\circ\text{C}$ par convention internationale.

10
$$F_0 = t.10^{(T-T_{ref}/z)}$$

Deux passages d'eau stérile (121,1°C 20 min) provenant du fermenteur, sont effectués dans la boucle avant la filtration des bactéries.

15 **2. Nettoyage, recyclage des membranes.**

La récupération des membranes après filtration est aisée mais doit suivre les consignes décrites ci-dessous :

- traitement par une solution NaOH 0,5 M à 45°C durant 30 minutes, pompe au débit maximal avant rinçage. Ainsi traitées, les membranes peuvent être réutilisées au moins 5 cycles reproductibles de production de *L.casei* concentré.

3. Le stockage des membranes en place.

L'ensemble du module est conservé avec une solution NaOH 0,1 M toutes vannes fermées si nécessaire.

4. Démarrage de l'étape de microfiltration.

Un des risques majeurs lors de l'utilisation de la technique de microfiltration est un colmatage important et rapide de la membrane.

Ce colmatage est caractérisé par trois phénomènes :

- 30
- adsorption et adhésion de particules et de solutés aux surfaces membranaires
 - couche de polarisation et formation d'un gâteau
 - obturation des pores

En règle générale, une pression transmembranaire faible ainsi qu'une vitesse de circulation tangentielle élevée sont des paramètres fondamentaux dans la conduite de cette opération.

5 *III Caractérisation de la plate-forme.*

1. Paramètre de mesure.

La plage de mesure est réalisée sur une durée de 300 minutes en moyenne.

En se référant aux essais réalisés (voir figure 2) la plage de temps comprise entre 15 et 175 minutes présente une phase de stabilité des pressions d'entrée et sortie module et par conséquent de la pression transmembranaire.

10 Cette plage de 160 minutes est représentative des conditions optimales de filtration qu'il faut maintenir.

Nos tableaux représentent les valeurs mesurées au début, au milieu et à la fin du temps de filtration.

15

1.1. Evolution des pressions

L'agent moteur de la séparation sélective sur une membrane poreuse est le différentiel de pression existant entre le circuit rétentat et le circuit perméat.

Tableau 1 : Evolution des pressions

ESSAI	Pentrée	$\Delta P /$ Pinitiale	Psortie	$\Delta P /$ Pinitiale	Pperméat	$\Delta P /$ Pinitiale	PTM
	Bar		bar				
Essai 1							
Pression initiale	1.245	/	0.119	/	0.166	/	0.528
Pt=150min	1.223	-0.022	0.144	0.025	0.145	-0.032	0.482
Pt=295min	2.382	1.137	0.212	0.093	0.206	0.04	1.062
P finale t=295.5min	2.415	1.170	0.218	0.099	0.216	0.05	1.075
Essai 2							
Pression initiale	1.187	/	0.117	/	0.164	/	0.493
Pt=150min	1.199	0.012	0.143	0.026	0.218	0.054	0.454
Pt=300min	2.309	1.122	0.175	0.058	0.252	0.088	0.928
P finale t=315min	3.179	1.992	0.275	0.158	0.299	0.135	1.426
Essai 3							
Pression initiale	1.230	/	0.118	/	0.134	/	0.518
Pt=150min	1.207	-0.023	0.145	0.027	0.220	0.086	0.454
Pt=300min	1.852	0.622	0.137	0.019	0.231	0.097	0.769
P finale t=328min	2.734	1.504	0.253	0.135	0.268	0.134	1.188
Essai 4							
Pression initiale	1.217	/	0.121	/	0.160	/	0.512
Pt=150min	1.197	-0.02	0.148	0.027	0.199	0.039	0.472
Pt=300min	2.045	0.828	0.153	0.032	0.217	0.057	0.834
P finale t=318.5min	3.009	1.792	0.285	0.164	0.258	0.098	1.371

-mesure de la pression transmembranaire (PTM)

5

$$PTM = ((P_{\text{entrée module}} + P_{\text{sortie module}}) / 2) - P_{\text{perméat}}$$

Avec pression entrée module égale à la pression de recirculation

Après 15 minutes de cycle, nous considérons l'ensemble du système stabilisé. La couche de polarisation est alors établie, les pressions globales ainsi que les débits se stabilisent.

5 Valeur moyenne mesurée lors des essais sur la plage de mesure stabilisée :

Pression d'entrée du module : 1,211 bar

Pression de sortie du module : 0.145 bar

Pression perméat : 0.196 bar

10 Evolution de la PTM 0.465 bar

1.2. Evolution des débits.

15 Tableau 2 : Evolution des débits et de la vitesse tangentielle

ESSAI	Qentrée		Qperméat		Vitesse de circulation
	l/h	m ³ /h	l/h	m ³ /h	m/s
Essai 1					
Débit initial	108.5	0.1085	2.22	0.00222	0.502
Q t=150min	127.1	0.1271	1.43	0.00143	0.588
Q t=295min	13.1	0.0131	0.99	0.00099	0.061
Q final t=295.5min	11.4	0.0114	0.97	0.00097	0.053
Essai 2					
Débit initial	107.3	0.1073	2.03	0.00203	0.497
Q t=150min	124.5	0.1245	1.44	0.00144	0.576
Q t=300min	66.3	0.0663	1.32	0.00132	0.307
Q final t=315min	20.7	0.02067	1.03	0.00103	0.096
Essai 3					
Débit initial	101.6	0.10159	2.32	0.002323	0.470
Q t=150min	122.8	0.12276	1.52	0.001516	0.568
Q t=300min	93.5	0.0935	1.41	0.001406	0.433
Q final t=328min	43.3	0.04326	1.48	0.001483	0.200
Essai 4					

Débit initial	107.2	0.1072	2.18	0.00218	0.496
Q t=150min	124.7	0.1247	1.55	0.00155	0.577
Q t=300min	83.2	0.0832	1.41	0.00141	0.385
Q final t=318.5min	29.3	0.0293	1.37	0.00137	0.136

-vitesse linéaire (m/s)

$V_t = Q(m^3/h) / (3600 \times \text{surface totale de filtration})$ en m/s

Avec surface de filtration totale = nombre de modules x nombre de canaux x

5 section (en m)

Sur la plage de mesure stabilisée :

	Débit rétentat maximal moyen mesuré :	124.8 l/h
10	Débit maximal perméat	2.19 l/h
	Débit perméat moyen :	1.46 l/h
	Vitesse tangentielle moyenne maximale :	0.579 m/s

15 1.3. Evolution de la température.

Lors de tous nos essais, l'élévation maximale mesurée par rapport à la consigne a été de 2°C .

Un échangeur thermique placé en sortie pompe ou module pourra aisément contenir cette élévation de température. De manière générale la température mesurée
20 est constante à 37°C avec un écart de mesure de 0,3°C.

1.4. Facteurs de concentration

Le facteur volumique de concentration (FCV) est de 10.

La population finale atteinte en batch est de 2.10^{10} ufc/ml. La population finale
25 mesurée dans le concentrât bactérien est supérieure à $1,5.10^{11}$ ufc/ml.

1.5. Reproductibilité de l'opération de filtration Celle-ci est évaluée par le tracé des courbes qui apparaissent sur les figures 3 à 5 ci après, pour les différents essais de filtration réalisés sur 4 semaines lors du test souris.

- 5 L'étape de filtration tangentielle dans les conditions décrites est parfaitement reproductible, les paramètres de débit, température et de pression sont maîtrisés durant l'étape de concentration de *L.casei*.

10 Plate-forme de filtration tangentielle : Conditions d'obtention d'une population finale de *L.casei* de 1.10^{11} ufc/ml.

➤ Conditions générales :

Population fin de batch : 2.10^{10} ufc/ml

15 Lavage des bactéries par une solution saccharosée (250 g/l) pression osmotique 1000 mOsm.

(injection par pompe / soutirage par filtration aux mêmes débits : 66 ml/min) :
durée 1h30

- Durée de filtration : durée 4 h

Tableau 3 : récapitulatif

Débits moyens	
Rétentat	125 l/h
Perméat	1.50 l/h
Pressions moyennes	
Entrée	1.21 bar
Sortie	0.14 bar
Perméat	0.19 bar
PTM	0.46 bar
Température	
37°C	
Vitesse tangentielle moyenne	
0.580 m/s	

5

10

15

20

25

30

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, à usage alimentaire comprenant les étapes successives suivantes :
- a) On propage les bactéries dans un fermenteur dans un milieu de culture approprié ;
- b) On adapte les bactéries obtenues à l'étape a) ;
- 10 c) On lave le milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle avec l'aide d'une solution de lavage ;
- d) On concentre en bactéries le milieu lavé contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle jusqu'à une concentration bactérienne supérieure à 5.10^{10} ufc/ml avantageusement supérieure à 1.10^{11} ufc/ml ;
- 15 e) On récupère un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, à usage alimentaire.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bactéries sont des bactéries lactiques, en particulier des bactéries du genre
- 20 *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Streptococcus* spp et *Lactococcus* spp.
3. Procédé selon la revendication 1 et 2, caractérisé en ce que le milieu de culture de l'étape a) est un milieu synthétique.
- 25 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le milieu de culture contenant les bactéries dans le fermenteur à la fin de l'étape a) a un pH compris entre 3 et 6.
- 30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en bactéries à la fin de l'étape a) de propagation est supérieure à 2.10^{10} ufc/ml.

- 5
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'adaptation des bactéries effectuée à l'étape b) est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture et/ou de paramètres des bactéries.
7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que les paramètres du milieu de culture sont le pH, la pression osmotique et/ou la température du milieu de culture.
- 10
8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est le pH et en ce que l'étape b) est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.
- 15
9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est la température et en ce que l'étape b) est réalisée par diminution de la température.
- 20
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.
11. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la distribution des longueurs de chaque bactérie se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.
- 25
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape b) d'adaptation est réalisée par microfiltration tangentielle.
- 30
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la ou les membranes de microfiltration tangentielle ont une porosité comprise entre 0,01 et 0,5 μm , avantageusement entre 0,1 et 0,3 μm .

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans l'étape c) la pression d'entrée du milieu de culture dans le module de microfiltration est comprise entre 0 et $3 \cdot 10^5$ Pa.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans les étapes c) et d) le débit du perméat est compris entre 0,001 et $0,1 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ de surface d'échange.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans l'étape d) la pression transmembranaire est comprise entre $0,1 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^5$ Pa et avantageusement entre $0,1 \cdot 10^5$ et $0,5 \cdot 10^5$ Pa.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans l'étape d) le débit de recirculation du milieu lavé est compris entre 0,5 et $3 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ de surface d'échange et avantageusement entre 0,8 et $1,2 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ de surface d'échange.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend préalablement à l'étape a) les étapes successives de revivification et préculture des bactéries.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire f), après l'étape e) de conditionnement en poches souples et hermétiques du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire g), après l'étape f), de conservation à une température comprise entre -50°C à $+4^\circ\text{C}$ du concentrât liquide de

bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples et hermétiques.

5 21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire h), après l'étape g), de réchauffage par un moyen adapté du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples et hermétiques.

10 22. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables à usage alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 21 caractérisé en ce qu'il comprend une cuve (1) contenant une solution de lavage, un conduit d'arrivée (2) de ladite solution de lavage dans un fermenteur (3), ledit fermenteur (3) servant à la propagation des bactéries dans un milieu de culture, un conduit de sortie (4) pour acheminer le milieu de culture
15 contenant les bactéries vers un ou plusieurs modules (5) de microfiltration tangentielle, lesdits modules (5) permettant la séparation dudit milieu de culture en un perméat (6) ne contenant pas de bactéries et en un concentrât (7) contenant les bactéries.

20 23. Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que le concentrât (7) est recyclé à la sortie des modules (5) de filtration par réincorporation dans le fermenteur (3).

25 24. Dispositif selon les revendications 22 et 23 caractérisé en ce que le ou les modules (5) de filtration comprennent de 1 à 10 membranes de filtration, chaque membrane représentant de 0,1m² à 150 m² de surface totale de filtration

30 25. Concentrât liquide de bactéries adaptées et viables caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

26. Utilisation du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon la revendication 25 en tant qu'additif alimentaire.

5 27. Produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon la revendication 25.

10 28. Produit alimentaire additivé selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un produit laitier et/ou d'une boisson.

15 29. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et préférentiellement avant le conditionnement du produit alimentaire.

1/5

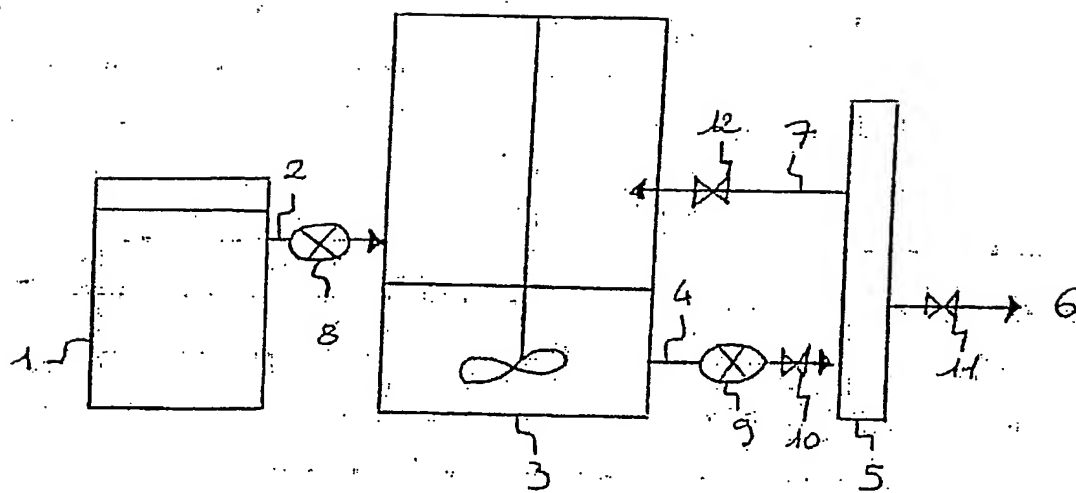


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

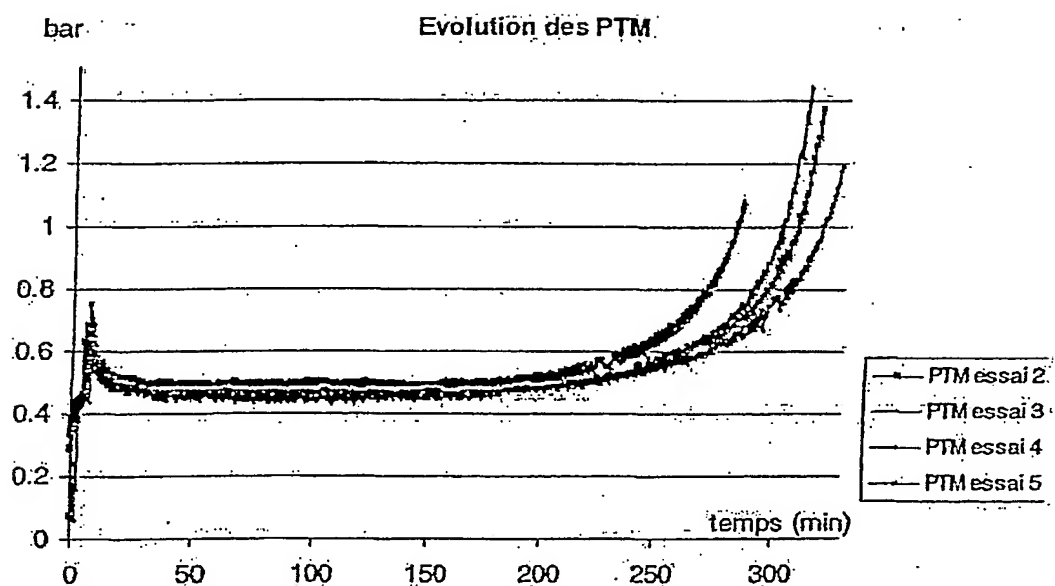


Figure 2

BEST AVAILABLE COPY

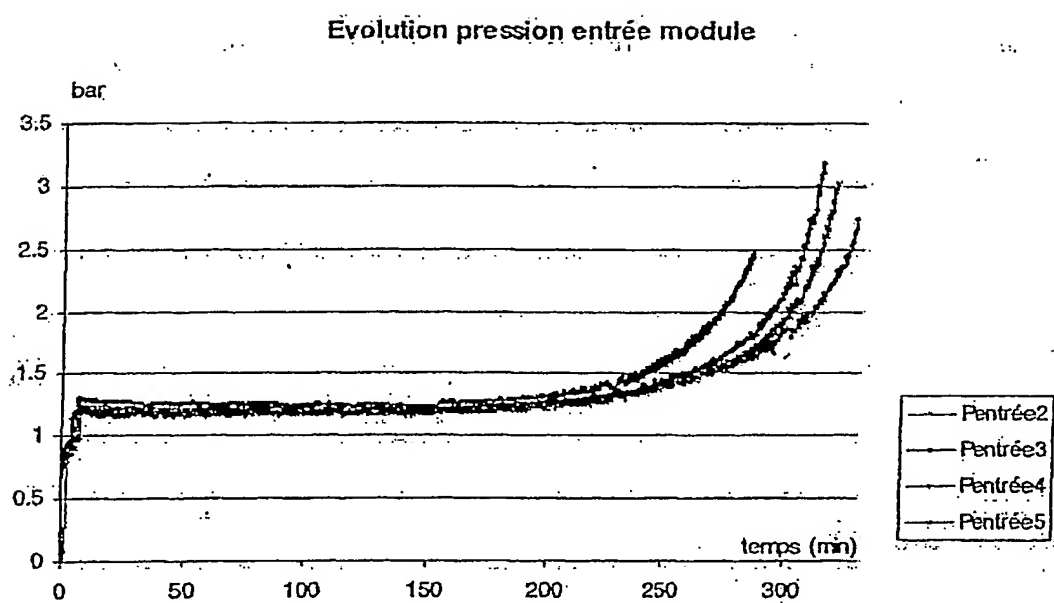


Figure 3

BEST AVAILABLE COPY

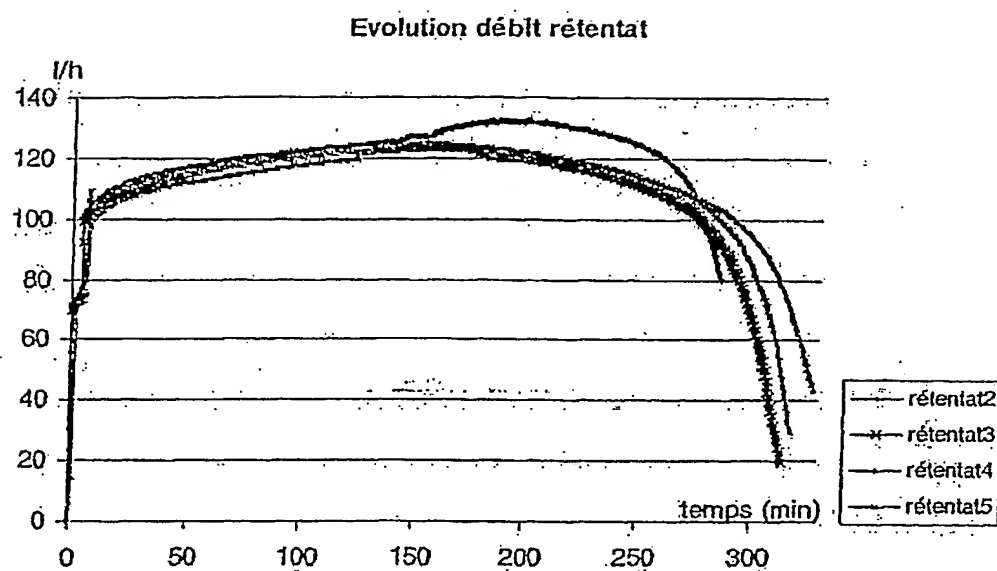


Figure 4

NOT AVAILABLE COPY

5/5

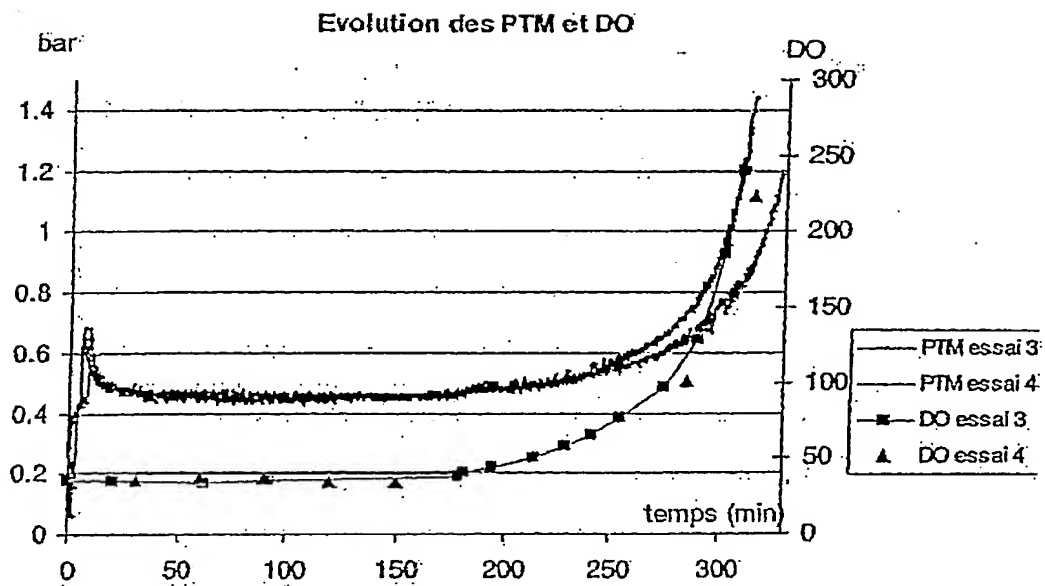


Figure 5

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR2005/000479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/02 C12M1/12 A23L1/30 A23L2/52 A23C9/152

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12M A23L A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CRESPO, J. P. S. G. ET AL: "Tangential flow filtration for continuous cell recycle culture of acidogenic bacteria" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 47(1), 205-14 CODEN: CESCAC; ISSN: 0009-2509, 1992, XP009034901 figure 1	22-24
X	MAUS J E ET AL: "Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria." JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1, 2003, pages 146-154, XP002334925 ISSN: 1364-5072	25-29
Y	the whole document	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *g* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 July 2005

Date of mailing of the international search report

09/09/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000479

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

X	SCHIRALDI CHIARA ET AL: "High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, (2003 APR 20) 82 (2) 213-22. JOURNAL CODE: 7502021. ISSN: 0006-3592; 20 April 2003 (2003-04-20), XP002291918 page 218	25-29
---	---	-------

Y		1-21
X	TANIGUCHI, MASAYUKI ET AL: "High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross - flow filtration" JOURNAL OF FERMENTATION TECHNOLOGY, 65(2), 179-84 CODEN: JFTED8; ISSN: 0385-6380, 1987, XP009050113 abrégé, figure 1	22-24

Y	HAYAKAWA K ET AL: "HIGH DENSITY CULTURE OF LACTOBACILLUS-CASEI BY A CROSS-FLOW CULTURE METHOD BASED ON KINETIC PROPERTIES OF THE MICROORGANISM" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 70, no. 6, 1990, pages 404-408, XP002335665 ISSN: 0922-338X the whole document	1-21
---	--	------

Y	SUZUKI TAKAHIRO: "A dense cell culture system for microorganisms using a stirred ceramic membrane reactor incorporating asymmetric porous ceramic filters" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 82, no. 3, 1996, pages 264-271, XP002335666 ISSN: 0922-338X the whole document	1-21
---	---	------

A	SCHIRALDI C ET AL: "Effective production of a thermostable alpha-glucosidase from Sulfolobus solfataricus in Escherichia coli exploiting a microfiltration bioreactor" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 70, no. 6, 20 December 2000 (2000-12-20), pages 670-676, XP002291919 ISSN: 0006-3592	
---	--	--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  de Internationale No
PCT/FR2005/000479

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N1/02 C12M1/12 A23L1/30 A23L2/52 A23C9/152

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12M A23L A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CRESP0, J. P. S. G. ET AL: "Tangential flow filtration for continuous cell recycle culture of acidogenic bacteria" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 47(1), 205-14 CODEN: CESCAC; ISSN: 0009-2509, 1992, XP009034901 figure 1	22-24
X	MAUS J E ET AL: "Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria." JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1, 2003, pages 146-154, XP002334925 ISSN: 1364-5072	25-29
Y	le document en entier	1-21
	----- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 juillet 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/09/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. de Internationale No

PCT/FR2005/000479

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SCHIRALDI CHIARA ET AL: "High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, (2003 APR 20) 82 (2) 213-22. JOURNAL CODE: 7502021. ISSN: 0006-3592., 20 avril 2003 (2003-04-20), XP002291918 page 218	25-29
Y	----- TANIGUCHI, MASAYUKI ET AL: "High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross - flow filtration" JOURNAL OF FERMENTATION TECHNOLOGY , 65(2), 179-84 CODEN: JFTED8; ISSN: 0385-6380, 1987, XP009050113 abrégé, figure 1	1-21
X	----- HAYAKAWA K ET AL: "HIGH DENSITY CULTURE OF LACTOBACILLUS-CASEI BY A CROSS-FLOW CULTURE METHOD BASED ON KINETIC PROPERTIES OF THE MICROORGANISM" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 70, no. 6, 1990, pages 404-408, XP002335665 ISSN: 0922-338X le document en entier	22-24
Y	----- SUZUKI TAKAHIRO: "A dense cell culture system for microorganisms using a stirred ceramic membrane reactor incorporating asymmetric porous ceramic filters" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 82, no. 3, 1996, pages 264-271, XP002335666 ISSN: 0922-338X le document en entier	1-21
A	----- SCHIRALDI C ET AL: "Effective production of a thermostable alpha-glucosidase from Sulfolobus solfataricus in Escherichia coli exploiting a microfiltration bioreactor" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 70, no. 6, 20 décembre 2000 (2000-12-20), pages 670-676, XP002291919 ISSN: 0006-3592	